Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n .

EIN VERFAHREN ZUR MANOMETRISCHEN AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON PHOSPHOLIPASE A.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Christa W a g n e r
aus Schönlinde / Č.S.R.

Würzburg 1956

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n .

EIN VERFAHREN ZUR MANOMETRISCHEN AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON PHOSPHOLIPASE A.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät

der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Christa W a g n e r

aus Schönlinde / Č.S.R.

Würzburg 1956

Tag der mündl. Prüfung:
16. Mai 1956

Referent: Professor Dr.phil. Dr.med. W. N e u m a n n

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

M E I N E N L I E B E N E L T E R N

Inhaltsübersicht

Einleitung Seite 1

Methodik Seite 2

Verwendete Substanzen Seite 3

A. Versuche mit Eigelb Seite 4

1. Streuung Seite 4

2. p_H-Abhängigkeit der Bienengift-Phospholipase Seite 5

3. Einfluß der Eigelbkonzentration Seite 7

4. Zeitlicher Verlauf des Lecithinabbaues Seite 8

5. Konzentrationsabhängigkeit der Bienengiftwirkung Seite 9

6. Vergleich von Bienengift und Crotalus-terrificus-Gift Seite 1o

7. Aktivitätsänderung durch Kationen und Anionen Seite 1o

a. Einfluß von $CaCl_2$, Na_2HPO_4, $ZnSO_4$ niederer Molarität Seite 11

b. Einfluß von $CaCl_2$, Na_2HPO_4, $ZnSO_4$ höherer Molarität Seite 12

c. Einfluß der Inhibitoren bei Durchströmung mit reinem Kohlendioxyd Seite 12

d. Einfluß von $ZnSO_4$ und $HgCl_2$ in hohen Konzentrationen, Aktivitätsänderung durch Erhitzen des gereinigten Bienengiftes Seite 13

B. Versuche mit Lecithin Seite 14

1. Streuung Seite 14

2. Bestimmung des pH-Optimums Seite 18

a. bei höherer Ca^{++}-Konzentration Seite 18

b. bei niedriger Ca^{++}-Konzentration Seite 19

3. Variation des Ca^{++}-Gehaltes Seite 2o

4. Einfluß des Lösungsvermittlers Tween 2o Seite 21

5. Einfluß von $ZnSO_4$ auf die Lecithin-Spaltung Seite 22

6. Abhängigkeit der Fermentreaktion von der Lecithin-Konzentration Seite 22

7. Zeitlicher Ablauf der Spaltung Seite 23

8. Dosis-Wirkungsbeziehung der Bienengift-Phospholipase Seite 26

9. Zur Frage der Stabilität von Lecithinemulsion und Giftlösung Seite 27

a. Versuche mit verschieden vorbehandelten Lecithinen Seite 27

b. Einfluß der Trocknungsart auf die Angreifbarkeit von Lecithin Seite 28

c. Versuche mit verschieden alten Giftlösungen Seite 28

10. Zur Frage der Wirkung der Lecithin-Spaltprodukte Seite 29

Besprechung Seite 30

Zusammenfassung Seite 33

Literaturverzeichnis Seite 36

Fermente, welche Lecithin in Lysocithin (Lysolecithin) und Fettsäure spalten, bezeichnet man als Phospholipase A. Sie kommen sowohl in tierischen Giften, z.B. Schlangen,-Bienen-und Wespengift, als auch in Organen wie Pankreas, Herz, Leber usw. vor (vergl. ZELLER).

Die am längsten bekannte biologische Wirkung von Phospholipase A ist ihre Fähigkeit, indirekt, d.h. auf dem Wege über das Lecithinspaltprodukt Lysocithin, Erythrozyten aufzulösen. So besitzt die hämolytische Fähigkeit zahlreicher tierischer Gifte eine "indirekte", lecithinasebedingte Komponente. Auch eine Reihe anderer Gifteffekte ist auf Lecithinspaltung zu beziehen. Nach DELEZENNE und LEDEBT führt Cobragift zu einer Hemmung der Hitzekoagulation von Eigelb, ein Phänomen, das auch BOQUET, DWORETZKY und ESSEX beobachten konnten. FLECKENSTEIN und Mitarbeiter zeigten, daß diese Wirkung nicht nur durch verschiedene Schlangengifte, sondern auch durch Bienengift hervorgerufen wird. Später bewiesen HABERMANN und NEUMANN, daß die darin enthaltene Phospholipase A die eigentliche Ursache darstellt. Schließlich ist auch eine Thrombokinase-und Dehydraseninaktivierung durch Phospholipoidspaltung bedingt. (s. Übersicht bei NEUMANN).

Die Aktivität von Phospholipase A kann durch quantitative Erfassung von Lecithin, Lysocithin oder Fettsäure verfolgt werden:

1., Verschwinden von Lecithin:
   a, Aufhellung einer verdünnten Lecithinemulsion (HABERMANN und NEUMANN)
   b, Änderung des Oberflächenpotentials eines Lecithinfilmes (HUGHES)
   c, Verminderung der mittels der Hydroxamatreaktion erfaßbaren Esterbindungen (RAPPORT und ALONZO, FRANZL und RAPPORT)
2., Auftreten von Lysocithin:
   Hämolysegrad einer mit vorbebrüteter Lecithinemulsion versetzten Erythrozytensuspension. Diese seit langem (Literatur s. NEUMANN und HABERMANN) (1) verwendete Methodik wurde von NEUMANN, HABERMANN und HANSEN, NEUMANN und HABERMANN (1), sowie LOTTER verbessert. Als Maß der Fermentaktivität wurde der Lecithase-Index eingeführt.
3., Auftreten von sauren Gruppen:
   a, Titration der abgespaltenen Fettsäure (FAIRBAIRN, HANAHAN)
   b, manometrische Methode

ZAMECNIK, BREWSTER und LIPMANN versuchten erstmals die enzymatische Aktivität der Phospholipase C im Clostridium Welchii-Toxin mano-

metrisch zu erfassen. Ihre Methodik fußte auf der durch Phosphorylcholin bewirkten CO_2-Freisetzung aus einem Bicarbonat und Kohlensäure enthaltenden Reaktionsgemisch. Unter anderem wurde p_H-Optimum, Einfluß von Aktivatoren und Inhibitoren, Abhängigkeit von Lecithin-und Fermentkonzentration untersucht. Auch die fermentative Spaltung von Lecithin in Lysocithin und Fettsäure - ein Phospholipase A-Effekt - (man verwendete das Gift der cotton mouth moccasin snake) konnte in orientierenden Versuchen manometrisch verfolgt werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wiesen ZAMECNIK und LIPMANN eine (je nach Art der gestellten Versuchsbedingungen) totale bzw. partielle Blockade der Clostridium-Welchii-Enzymwirkung durch Antitoxin nach. Phospholipase A des Crotalus-terrificus-Giftes verhielt sich ähnlich.

Obwohl also ZAMECNIK und LIPMANN neben der von ihnen hauptsächlich untersuchten Phospholipase C auch Phospholipase A manometrisch bestimmten, sind doch keinerlei Arbeiten über Kinetik und Wirkungsmechanismus dieses Fermentes im Warburgansatz bekannt. Eine eingehende Prüfung der manometrischen Methodik erschien jedoch erforderlich, da sie erlaubt, die quantitativen und die zeitlichen Verhältnisse der Reaktion gleichzeitig zu erfassen. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die bereits von HABERMANN begonnenen Versuche, Lecithasen von Insekten-und Schlangengift und deren Wirkungsbedingungen auf manometrischem Wege zu bestimmen, weitergeführt und ausgearbeitet werden.

M e t h o d i k

Prinzip:

Da Lecithase A aus Lecithin neben Lysocithin auch Fettsäure freisetzt, wird im Rahmen der Lecithin-Spaltung aus einer mit einer Kohlendioxydatmosphäre im Gleichgewicht stehenden Bicarbonatlösung CO_2 ausgetrieben, das nun mit dem Warburg-Manometer gemessen und als Maß der Lecithaseaktivität gewertet werden kann.

Vorbereitung der Manometer:

Vor Versuchsbeginn fand eine gründliche Säuberung der Manometer-Kölbchen statt. Nach einer 2-stündigen Xylol-Reinigung wurden sie eine halbe Stunde in Persil gekocht, anschließend mit Leitungswasser gespült, eine Stunde in Bichromatschwefelsäure gelegt, mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült,getrocknet,mit "Desicote" silikoniert, mit Leitungswasser und Aqua bidest. nachgespült und getrocknet.
Die Manometerschliffe wurden nur mäßig mit Exsiccatorfett eingerieben;

es sollte ein absolut luftdichter Verschluß erzielt werden, aber kein Fett in das Innere der Kölbchen dringen. Fett kann nämlich das während der Durchströmung kühle CO_2-Gas absorbieren, welches dann während des Versuches allmählich wieder abgegeben und so zu einer Fehlerquelle werden kann.

Herstellung der Lecithinemulsion:

Lecithin wurde 1:5o in 0,85%iger Kochsalzlösung suspendiert. Es löste sich darin natürlich nicht vollständig; man konnte jedoch durch 1-stündiges Stehenlassen eine weitgehende, milchartige Emulgierung erreichen. Unter Einwirkung des Fermentes klärte sich die Emulsion (Lysocithin ist wasserlöslich).

Versuchsausführung:

Hier sei nur unser "Standard-Versuchsansatz" beschrieben, der sich im Laufe unserer Experimente als optimal erwiesen hatte. Variationen werden im einzelnen angegeben werden.

In das Hauptgefäß der Kölbchen kamen 3 ccm des Reaktionsgemisches (1 ccm 2%ige Lecithinemulsion + 1 ccm Tween 2o 12,5% + 0,5 ccm 0,0033m $CaCl_2$ + 0,5 ccm 0,3m $NaHCO_3$, bzw. 1 ccm 2o%ige Eigelbemulsion + 1 ccm 0,3m $NaHCO_3$ + 1 ccm 0,85% NaCl). In den Seitenarm pipettierte man 0,3 ccm der Giftlösung. Das Gift wurde in einem dem verhältnis im Hauptgefäß entsprechenden Gemisch von NaCl und $NaHCO_3$ gelöst. Anschließend befestigte man die Kölbchen an den Manometern, brachte sie in ein Wasserbad (38°C), durchströmte 5 Min. lang mit N_2-CO_2-Gas (95:5), schloß dann die Ventile am Seitenarm und die Hähne am Manometer. Die Kölbchen wurden nun mit der Hand so lange gedreht, bis die Manometer-Kölbchen-Verbindung ganz fest war. Dann wurde 15 Min. lang geschüttelt. Die Menisci wurden auf Marke 15,0 eingestellt. Nach Hinzukippen des Inhaltes des Seitenarmes zum Hauptgefäß setzte die Fermentreaktion ein. Die erste Ablesung erfolgte nach 5 Minuten.

Verwendete Substanzen:

Lecithin wurde von HABERMANN nach HANAHAN chromatographisch gereinigt und unter Aceton in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Das nach MAGISTRIS dargestellt Lysocithin unterzog HABERMANN (unveröffentlicht) einer chromatographischen Reinigung.

Gereinigtes Bienengift (Charge 52) wurde von der Firma HEINRICH MACK NACHF.,Illertissen/Bayern zur Verfügung gestellt. (Aus Platzmangel mußte bei den meisten Tabellen gereinigtes Bienengift mit Pg = Pikratgift abgekürzt werden)

Als Ölsäure kam ein Präparat von E.MERCK/Darmstadt zur Verwendung.

Tween 2o wurde von der Firma C.F. BOEHRINGER u. SÖHNE/Mannheim vermittelt.

Die Warburg-Kölbchen stammten zum Teil von der Firma BRAUN, zum anderen

Teil von der Firma MACHLETT.
Das Silikonöl-Präparat "Desicote" wurde von der Firma BECKMAN-Pasadena/Calif. bezogen.

A. Versuche mit E i g e l b

1. Streuung.

Eigelbemulsion und die verschiedenen Reagenzien wurden vor Versuchsbeginn zusammengegeben, um eine eventuelle Ungenauigkeit beim Einpipettieren der einzelnen Substanzen auszuschalten. In das Hauptgefäß kamen 3 ccm des Reaktionsgemisches, das Seitengefäß enthielt 0,3 ccm der Giftlösung.

Ansatz:

Kölbchen 1-15: Hauptgefäß: 1 ccm Eigelb 2o% + 2 ccm $NaHCO_3$ 0,15m
Seitengefäß: 0,3 ccm Pg. 1:4oooo.

Kölbchen 16 diente als Thermobarometer.

Ergebnis: cmm freigesetztes CO_2/3o Min.

98, 104, 100, 109, 96, 101, 101, 99, 99, 101, 104, 99, 104, 106, 102.

Die auftretende Streuung beträgt maximal ± 5%.

Bei einem weiteren Streuungsversuch wurde nicht silikoniert. Dieser Ansatz sollte ursprünglich Hühner-Eigelb verschiedener Herkunft auf sein Verhalten gegenüber Phospholipase A prüfen.

Ansatz:

	1 ccm	+ 2 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.	
1.	Eigelb I 2o%	$NaHCO_3$ 0,15m	Pg. 1:4oooo	7o,2	B
2.	"	"	"	106,5	M
3.	"	"	NaCl 0,85%	-13,6	M
4.	Eigelb II 2o%	"	Pg. 1:4oooo	56	B
5.	"	"	"	102	M
6.	"	"	NaCl 0,85%	-12,3	M
7.	Eigelb III 2o%	"	Pg. 1:4oooo	106	M
8.	"	"	"	112	M
9.	"	"	NaCl 0,85%	-14,3	B
10.	Eigelb IV 2o%	"	Pg. 1:4oooo	85	B
11.	"	"	"	85	B
12.	"	"	NaCl 0,85%	-8,5	B
13.	Eigelb V 2o%	"	Pg. 1:4oooo	115	M
14.	"	"	"	90	B
15.	"	"	NaCl 0,85%	-8,5	B

M = Kölbchen der Firma Machlett,
B = Kölbchen der Firma Braun.

Ergebnis: Der Ansatz streut stark, die zu niedrigen CO_2-Werte werden deutlich bei den von der Firma Braun bezogenen Kölbchen registriert.

Bei den nächsten Versuchen wurden die Kölbchen neben der üblichen Reinigung wieder silikoniert.

Ansatz: Hauptgefäß, Kölbchen 1-9:
1 ccm Eigelb 2o% + 2 ccm $NaHCO_3$ 0,15m
Seitenarm: 0,3 ccm Pg. 1:4oooo

Ergebnis: cmm CO_2/3o Min.
99, 98, 101, 100, 101, 102, 101, 106, 99.

Da durch das Silikonieren die Streuung in geringen Grenzen gehalten werden konnte, wurden daraufhin stets vor Versuchsbeginn die Kölbchen mit Desicote gespült. Es zeigte sich jedoch, daß auch die Bichromatschwefelsäurebehandlung vor jedem Versuch durchgeführt werden mußte, da große Streuwerte auftraten, als Bichromatschwefelsäure während ca 3 Versuchsreihen keine Anwendung fand.
Aus diesen Versuchen ist der Schluß zu ziehen, daß n u r b e i e x t r e m e r S a u b e r k e i t d e r R e a k t i o n s g e f ä ß e z u v e r l ä s s i g e P h o s p h o l i p a s e b e s t i m m u n g e n m ö g l i c h s i n d .

2. p_H-Abhängigkeit der Bienengift-Phospholipase im Eigelbansatz.

Ansatz:

1 ccm + 2 ccm		0,3 ccm	cmm CO_2/ 3o Min	p_H
1. Eigelb 2o%	$NaHCO_3$ 0,075m	Pg. 1:15ooo	93	8,o2
2. "	"	"	91,5	
3. "	"	$NaCl$-$NaHCO_3$ (0,075m)	2,4	
4. "	$NaHCO_3$ 0,15m	" (0,15m)	5,7	8,32
5. "	"	Pg. 1:15ooo	1o5	
6. "	"	"	98	
7. "	$NaHCO_3$ 0,3m	"	71,6	8,62
8. "	"	"	71.7	
9. "	"	$NaCl$-$NaHCO_3$ (0,3m)	6	
1o. NaCl 0,85%	"	"	3,4	
11. Eigelb 2o%	$NaHCO_3$ 0,075m	Pg. 1:15ooo	41,5	6,68
12. "	"	"	37	
13. "	"	$NaCl$-$NaHCO_3$ (0,075m)	2,3	
14. "	$NaHCO_3$ 0,15m	Pg. 1:15ooo	6o	6,98
15. "	"	"	59,5	
16. "	"	$NaCl$-$NaHCO_3$ (0,15m)	-0,7	
17. "	$NaHCO_3$ 0,3m	Pg. 1:15ooo	74	7,28
18. "	"	"	73,6	
19. "	"	$NaCl$-$NaHCO_3$ (0,3m)	-3	
2o. diente als Thermobarometer.				

Die Ansätze in Nr. 3,4,9,13,16 und 19 sollen zeigen, in wie weit eine "spontane" CO_2-Freisetzung erfolgt.
1-10 wurde mit N_2-CO_2 (95:5), 11-20 mit CO_2 durchströmt.

Ergebnis: Das p_H-Optimum liegt bei p_H 8,3 (vgl. Abb. 1).

Errechnung der p_H-Werte nach der Hasselbalch'schen Formel:

$$p_H = pK + \log\left[NaHCO_3\right] - \log pCO_3 - \log\frac{\alpha}{760 \cdot 22,4}$$

(pK = const.; pCO_2 = CO_2-Druck in mm Hg; α = Löslichkeit von CO_2 bei 38° (ccm Gas/ccm Flüssigkeit))

pK	log $NaHCO_3$	log pCO_2	log $\frac{\alpha}{760 \cdot 22,4}$	
pH = 6,36 + 0,699-2	- 1,544	-0,498 + 5	= 12,059 - 4,042	= 8,02
pH = 6,36 - 1	- 1,544	-0,498 + 5	= 11,36 - 3,04	= 8,32
pH = 6,36 + 0,301-1	- 1,544	-0,498 + 5	= 11,66 - 3,04	= 8,62
pH = 6,36 + 0,699-2	- 2,881	-0,498 + 5	= 12,06 - 5,38	= 6,68
pH = 6,36 - 1	- 2,881	-0,498 + 5	= 11,36 - 4,38	= 6,98
pH = 6,36 + 0,301-1	- 2,881	-0,498 + 5	= 11,66 - 4,38	= 7,28

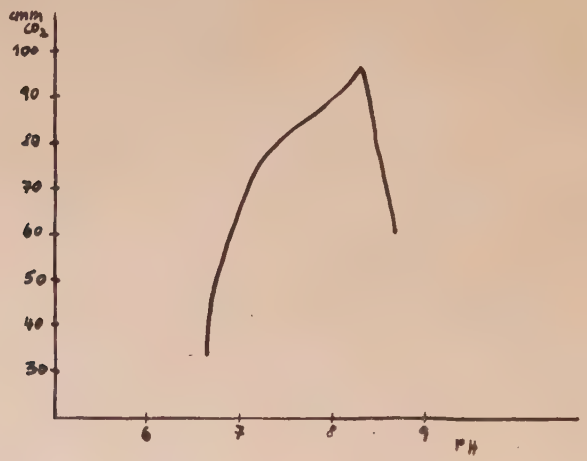


Abb. 1. p_H-Abhängigkeit der Bienengift-Phospholipase im Eigelbansatz.

Ordinate: cmm CO_2/3o Min.
Abszisse: p_H.

Ansätze: s. Text.

3. Einfluß der Eigelbkonzentration.

Ansatz:

2 ccm	+ 1 ccm	0,3 ccm		cmm CO_2/3o Min
1. $NaHCO_3$ 0,15m	Eigelb 2o%	$NaCl-NaHCO_3$		6,0
2.	"	Pg. 1:15ooo	N	11o
3.	"	"	N	11o
4.	"	"	A	109
5.	"	"	A	109
6.	Eigelb 1o%	"	N	81
7.	"	"	N	77
8.	Eigelb 5%	"	N	48
9.	"	"	N	51
1o.	"	$NaCl-NaHCO_3$		6,7

Der Versuch soll neben der Eigelbkonzentrationsabhängigkeit klären, ob das Alter der Giftlösung eine Rolle spielt. Ein Teil des Giftes wurde daher direkt vor Versuchsbeginn (N), der andere einige Stunden (A) vorher in Lösung gebracht.

Ergebnis: Abb. 2 zeigt eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit im Eigelbansatz. Es besteht jedoch im untersuchten Bereich keine einfache Proportionalität zwischen Steigerung der Eigelbkonzentration und Zunahme der CO_2-Freisetzung. Einer Erhöhung der Eigelbkonzentration auf das Vierfache steht eine nur 2,3 fache Erhöhung der Eigelbspaltung gegenüber. Es ist zu vermuten, daß bei weiterer Steigerung der Eigelbkonzentration allmählich ein Grenzwert der Fermentsättigung erreicht wird.
Die Tabelle zeigt außerdem, daß die Fermentwirkung im untersuchten Bereich auch bei verschiedenem Alter der Giftlösungen unverändert bleibt.

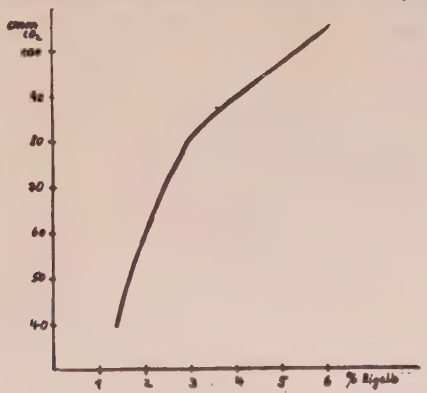


Abb. 2. Einfluß der Eigelbkonzentration auf die Aktivität der Bienengiftphospholipase.
Ordinate: cmm CO_2/3o Min.; Abszisse: Eigelb-Endkonzentration in %
Ansätze: s. Text.

4. Zeitlicher Verlauf des Lecithinabbaues.

Als typisches Beispiel für den zeitlichen Ablauf der Lecithinspaltung im Eigelbansatz werden in Abb. 3 die Werte des in Abschnitt 3 angeführtem Versuches wiedergegeben. Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Ansätzen wurden ähnliche Kurven wiedergefunden, sodaß sich eine ausführlichere Darstellung erübrigt. Stets nahm die Geschwindigkeit der Lecithinspaltung im Eigelbansatz mit der Zeit ab.

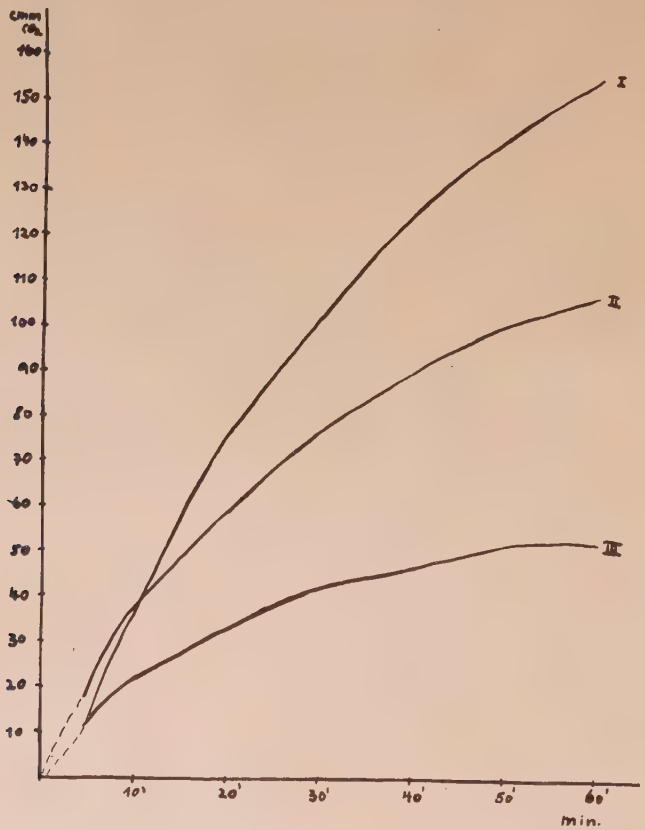


Abb. 3. Zeitlicher Ablauf des Lecithinabbaues im Eigelbansatz.
Ansätze: Hauptgefäß: 1 ccm 2o% (=I), bzw. 1o% (=II), bzw. 5% (=III) Eigelb + 2 ccm $NaHCO_3$ 0,15m
Seitengefäß: 0,3 ccm gereinigtes Bienengift 1:4oooo
Ordinate: cmm CO_2; Abszisse: Zeit in Minuten.

5. Konzentrationsabhängigkeit der Bienengiftwirkung.

Ansatz: In den Hauptgefäßen aller Kölbchen:
1 ccm Eigelb 2o% + 2 ccm $NaHCO_3$ 0,15m
Seitenarme: 0,3 ccm einer Bienengiftverdünnungsreihe 1:1oooo, 1:2oooo, 1:4oooo, 1:8oooo, 1:16oooo, 1:32oooo.
(Verdünnung in einem Gemisch von 1 Teil 0,85% NaCl und 2 Teilen 0,15m $NaHCO_3$).
Das freigesetzte CO_2 wird in cmm/3o Min. angegeben.

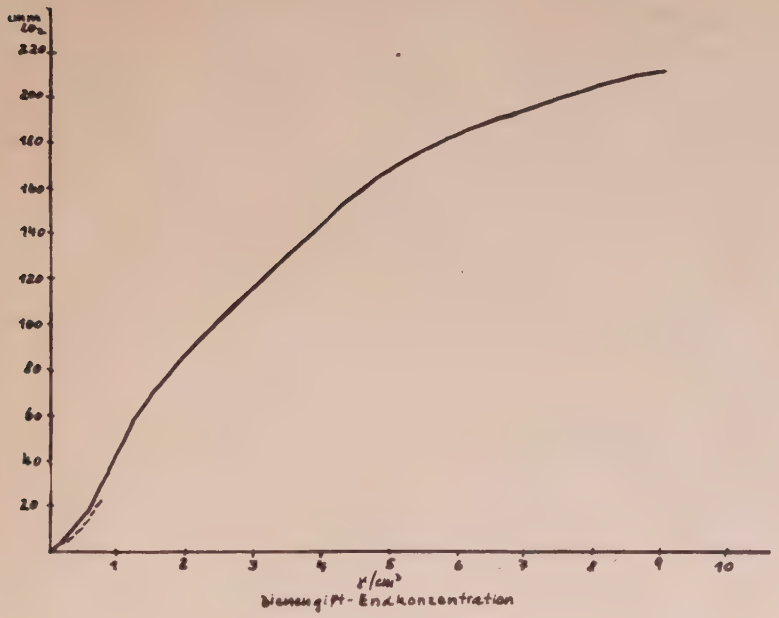


Abb. 4. Konzentrationsabhängigkeit der Bienengiftwirkung.
Ordinate: cmm CO_2/3o Minuten
Abszisse: Bienengiftmenge in γ pro ccm des Bebrütungsansatzes.
Ansätze: s. Text.

Ergebnis: 9,1 γ/ccm = 213 cmm CO_2
4,55 γ/ccm = 159 cmm CO_2
2,28 γ/ccm = 97 cmm CO_2
1,14 γ/ccm = 52 cmm CO_2
0,57 γ/ccm = 15 cmm CO_2
0,29 γ/ccm = 6 cmm CO_2

Bei einem zweiten Versuch mit größeren Giftverdünnungen 1:12oooo, 1:24oooo, 1:48oooo sind

0, 75γ/ccm = 21,2 cmm CO_2
0,37 γ/ccm = 7 cmm CO_2
0,18 γ/ccm = 3 cmm CO_2

Die Lecithinspaltung im Eigelbansatz steigt mit der Fermentkonzentration; es besteht jedoch keine lineare Proportionalität. Vielmehr scheint, wie der leicht S-förmige Verlauf der Kurve zeigt, ein verwickeltes Verhältnis von Aktivierung und Hemmung vorzuliegen. (vgl. S.26)

6. Vergleich von Bienengift und Crotalus-terrificus-Gift.

Ansatz:

		0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	1 ccm Eigelb 2o%	Cr.t. 1:2ooo	137
2.	+	"	129
3.	2 ccm $NaHCO_3$ 0,15m	Cr.t. 1:1oooo	59
4.		"	6o

Die Werte dieses Versuches sind mit den auf Abb.4 eingezeichneten direkt vergleichbar, da sie am gleichen Tage mit dem gleichen Eigelb gewonnen wurden.

Ergebnis: Die Fermentaktivität des Crotalus-terrificus-Giftes ist bei weitem geringer als die des Bienengiftes. 9,1γ/ccm des Schlangengiftes entsprechen bezüglich ihrer Wirksamkeit 1,14γ gereinigten Bienengiftes /ccm. Die annähernd 8 x schwächere Lecithase-Aktivität von Crotalus-terrificus-Gift entspricht seinem Lecithaseindex von 0,13, den HABERMANN bei früheren Untersuchungen mit anderer Methodik gefunden hat.

7. Aktivitätsänderung durch Kationen und Anionen.

Die aktivierende Wirkung von Calcium auf verschiedene Lecithasen ist schon seit langem bekannt. DELEZENNE und FOURNEAU, KUDICKE und SACHS wiesen auf eine Aktivierung der Cobragift-Hämolyse durch Calcium-Salze hin. NEUMANN und HABERMANN (1) sowie LOTTER konnten bei ihren Versuchen eine deutliche Aktivierung der Bienengift-Phospholipase durch Ca^{++}-Zusatz nach-

weisen und standen damit im Gegensatz zu OGAWA, der keine Ca^{++}-Aktivierung der Pferdepankreas-Lecithase fand. NEUMANN und HABERMANN (1) untersuchten ferner den hemmenden Einfluß der Na-Halogenide auf Bienengiftlecithase und fanden einen Wirkungsabfall im Sinne der Hofmeister'schen Reihe. Auch im Dotterkoagulationstest wurde die Inaktivierung durch Fluorid beobachtet (FLECKENSTEIN und FETTIG, HABERMANN und NEUMANN), das nach OGAWA auf Pankreaslecithase, nach HUGHES auf Schlangengiftlecithasen nicht hemmend wirken soll.

Nach LOTTER scheint das Phosphat-Ion zu hemmen. Schwermetallionen, Zn, Cd, Ni, HgII inhibieren im Dotterkoagulations-und Haemolysetest die Bienengiftlecithase (NEUMANN und HABERMANN (1), HABERMANN und NEUMANN), Effekte, die z.T. auch FLECKENSTEIN und GERKHARDT sowie JÄGER im Dotterkoagulations-und Dehydrasentest beobachtet haben.

Unsere Versuche sollten den Einfluß einzelner Substanzen auf die Phospholipase A im Eigelbansatz manometrisch erfassen.

a., Einfluß von $CaCl_2$, NaF, Na_2HPO_4 niederer Molarität.

Ansatz:

		+ 1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min
1.	1 ccm	NaCl 0,85%	Pg. 1:4oooo	127
2.		$CaCl_2$ 0,066m	"	125
3.	Eigelb 2o%	$CaCl_2$ 0,0066m	"	118
4.		NaCl 0,85%	"	117
5.		NaF 0,1m	"	99
6.		NaF 0,01m	"	110
7.	+	NaF 0,001m	"	106
8.		Na_2HPO_4 0,1m	"	98,4
9.		Na_2HPO_4 0,01m	"	110
1o.	1 ccm	Na_2HPO_4 0,001m	"	106
11.		Na_2HPO_4 0,1m	NaCl-$NaHCO_3$	-1,7
12.	$NaHCO_3$ 0,3m	$CaCl_2$ 0,066m	"	6,9
13.		NaF 0,1m	"	-0,8
14.		NaCl 0,85%	Cr.t. 1:14ooo	85
15.		"	"	8o,5
16.		Na_2HPO_4 0,1m	"	5,3
17.		Na_2HPO_4 0,01m	"	41,6
18.		Na_2HPO_4 0,001m	"	63,5

Nr. 1 und 4 zeigen die Fermentwirkung auf Eigelb, 11-13 die Reaktion der Aktivatoren bzw. Inhibitoren ohne Fermentzusatz.
In 16-18 soll die Beeinflußbarkeit von Crotalus-terrificus-Gift veranschaulicht werden.

b., Einfluß von $CaCl_2$, Na_2HPO_4, $ZnSO_4$ höherer Molarität.

Ansatz:

		+ 1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	1 ccm	$CaCl_2$ 0,13m	Pg. 1:4oooo	149
2.		" 0,033m	"	118
3.		Na_2HPO_4 0,2m	"	86
4.	Eigelb 2o%	" 0,05m	"	108
5.		NaF 0,2m	"	83
6.		" 0,05m	"	109
7.		$ZnSO_4$ 0,05m	"	8
8.	+	" 0,025m	"	3
9.		" 0,0125m	"	7
1o.		" 0,00625m	"	22
11.	1 ccm	NaCl 0,85%	"	114
12.		"	NaCl-$NaHCO_3$	0
13.		$CaCl_2$ 0,13m	"	17
14.	$NaHCO_3$ 0,3m	NaF	"	-3
15.		Na_2HPO_4 0,2m	"	-1
16.		$ZnSO_4$ 0,05m	"	7

Nr. 11: Eigelb-Lecithin-Spaltung, 12-16 Reaktion ohne Fermentzusatz.
$CaCl_2$ 0,039m und $ZnSO_4$ 0,0151m verursachen starke Trübung der Eigelbemulsio

c., Einfluß der Inhibitoren bei Durchströmung mit reinem Kohlendioxyd.

Ansatz:

		+ 1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	1 ccm	NaCl 0,85%	Pg. 1:4oooo	76
2.		NaF 0,2m	"	13
3.		" 0,02m	"	5o
4.	Eigelb 20%	$CaCl_2$ 0,132m	"	7o
5.		" 0,0132m	"	8o
6.		Na-Zitrat 0,2m	"	37
7.		" 0,02m	"	85
8.	+	$ZnSO_4$ 0,001m	"	66
9.		" 0,0001m	"	73
1o.	1 ccm	$HgCl_2$ 0,001m	"	71
11.		" 0,0001m	"	71
12.		NaF 0,2m	NaCl-$NaHCO_3$	7
13.	$NaHCO_3$ 0,3m	$CaCl_2$ 0,132m	"	7
14.		$ZnSO_4$ 0,001m	"	2
15.		Na-Zitrat 0,2m	"	0
16.		$HgCl_2$ 0,001m	"	0

Nr. 2 Eigelb-Lecithin-Spaltung, Nr. 12-16 Reaktionsgemisch ohne Fermenteinfluß.

Bei der Durchströmung mit reinem CO_2 steigert sich die Dissoziation der Ca^{++}- und Schwermetallsalze. Der Versuch soll prüfen, ob die Wirkung der hemmenden Komponenten im sauren Milieu begünstigt wird.

d., Einfluß von $ZnSO_4$ und $HgCl_2$ in höherer Konzentration, Aktivitätsänderung durch Erhitzen des gereinigten Bienengiftes.

Die relativ große Hitzebeständigkeit verschiedener Lecithasen ist bekannt. FLEXNER und NOGUCHI nützten die große Temperaturstabilität der Cobragift-Phospholipase, HANAHAN und GRONCHI die der Pankreaslecithase zur Abtrennung anderer gleichzeitig vorhandener Wirkstoffe aus. ROUSSEAU und HUGHES geben die Hitzebeständigkeit anderer Schlangengift-Phospholipasen (im sauren Milieu) an. NEUMANN und HABERMANN (1) sowie HABERMANN und NEUMANN beschreiben eine Zunahme der Hitzeempfindlichkeit der Bienengift-Lecithase bei steigenden p_H-Werten.

Ansatz:

	+ 1 ccm		0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	1 ccm Eigelb 2o%	NaCl 0,85%	NaCl-$NaHCO_3$	2
2.		$ZnSO_4$ 0,01m	"	-3
3.		$HgCl_2$ 0,01m	"	-4
4.	+ 1 ccm $NaHCO_3$ 0,3m	NaCl 0,85%	Pg. 1:40000	8o
5.		$ZnSO_4$ 0,01m	"	6
6.		$HgCl_2$ 0,01m	"	-4
7.		NaCl 0,85%	Pg. erhitzt 1:40000	67

Nr. 1-3 Volumänderung ohne Fermenteinwirkung,
4 Eigelb-Lecithin-Spaltung,
7 Bienengift wurde 1:1000 in 0,85%igem NaCl gelöst und 15 Minuten bei 98°C erhitzt. Anschließend wurde das durch Wasserdampf verlorengegangene Lösungsverhältnis 1:1000 berichtigt, die Giftlösung in einem Gemisch von 2 Teilen NaCl (0,85%) und einem Teil $NaHCO_3$ (0,3m) weiter verdünnt.

Ergebnis: $CaCl_2$ aktiviert in 0,o3m Lösung leicht (Versuch b), in 0,02m Lösung und darunter ist es ohne eindeutigen Einfluß (Versuch a). Auch im sauren Milieu (Durchströmung mit 1oo% CO_2) ist kein signifikanter Effekt zu erzielen (Versuch c).

NaF hemmt in 0,0604m Lösung deutlich (Versuch b), nicht mehr deutlich dagegen in 0,0302m Lösung und darunter (Versuch a). Im sauren Milieu (Versuch c) hemmt Fluorid erheblich stärker als im üblichen schwach alkalischen. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß im Sauren mehr Ca^{++} im dissoziierten und somit durch Fluorid fällbaren Zustand vorliegt.

Na-Zitrat hemmt im Sauren noch in 0,00604m Lösung sehr stark (Versuch c).

Sec. Phosphat ist ein nur schwacher Inhibitor der Bienengift-Phospholipase (0,0604m) (Versuch b), dagegen hemmt es die

Crotalus-terrificus-Phospholipase sehr stark (0,000302m) (Versuch a).
Zinksulfat hemmt in 0,0019m Lösung sehr stark (Versuch b), in saurer Lösung dürfte die Schwelle bei 0,0003m liegen (Versuch c)
Quecksilber II-Chlorid hemmt in 0,00302m Lösung sehr stark (Versuch d); 0,000302m $HgCl_2$ inhibiert im Sauren nicht (Versuch c).
Erhitzen (15 Minuten auf 98°C in ungepufferter Kochsalzlösung) schwächt die Bienengiftphospholipase um ca 17% ab (Versuch d).

B. Versuche mit L e c i t h i n .

1. Streuung.

Die manometrische Methode zur Erfassung der fermentativen Spaltung von Lecithin wurde schon vor einiger Zeit an unserem Institut versucht (HABERMANN). Die Streuung war geringfügig, sodaß diese Arbeitsmethode durchaus brauchbar schien. Da bei unseren Versuchen jedoch zunächst eine außerordentliche Streuung auftrat, die auch durch peinliches Arbeiten Arbeiten nicht zu vermeiden war, mußte zuerst der die Streuung verursachende Faktor aufgedeckt werden. Wir prüften daher, ob etwa verschieden starke Niederschlagsbildung oder ein verschieden starker Emulsionsgrad des Lecithins eine Rolle spielte.

Ansatz: Hauptgefäße aller Kölbchen:
1 ccm Lecithin 2% + 1 ccm Tween 2o 12,5% + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0,066m + 0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,6m.
Seitenarme: 0,3 ccm gereinigtes Bienengift 1:2oooo.

Die Kölbchen 1-4, 11-14 füllte man mit je 3 ccm des vorher vereinigten Reaktionsgemisches (a), in die restlichen Kölbchen wurden die Reagenzien einzeln einpipettiert (b). Kölbchen 18 diente als Thermobarometer.

Ergebnis: cmm CO_2/3o Minuten.
a., 129, 160, 158, 150,
81, 127, 141, 120.
b., 162, 172, 74, 89, 162,
160, 158, 95, 175.

Es zeigte sich eine unabhängig von der Art des Einpipettierens starke Streuung. Bei mehrfacher Wiederholung dieses Ansatzes und ähnlicher Versuche konnten wir feststellen, daß die besonders niedrigen CO_2-Werte bei ganz bestimmten Kölbchen auftraten. Es handelte sich um die bei unseren Versuchen erstmals in Gebrauch genommenen Gefäße der Firma Braun (siehe Versuche über Streuung im Eigelbansatz).
Der nächste Versuch sollte klären, ob eine Variation der $CaCl_2$-Niederschläge für die Streuung mitverantwortlich ist.

Ansatz: Hauptgefäße aller Kölbchen:
1 ccm Lecithin 2% + 1 ccm Tween 2o 12,5% + 1 ccm $NaHCO_3$ 0,3m
Seitenarm: 0,3 ccm gereinigtes Bienengift 1:1oooo
M = Kölbchen der Firma Machlett, B = Kölbchen der Firma Braun.

Ergebnis: cmm CO_2/3o Minuten.
M, 80, 106, 100, 82, 109, 120, 92, 104, 12o, 184.
B, 96, 35, 62, 75, 50, 73, 88.
Die Streuung wird nicht durch Ca^{++} verursacht. Eine deutliche Bevorzugung der Kölbchen der Firma Braun für abwegige CO_2-Werte steht auch hier im Vordergrund.

Ein weiterer Versuch der Streuung Herr zu werden, bestand in einer Abänderung der bisher üblichen Reinigung. Die Kölbchen wurden 2 Stunden in Xylol belassen, mit warmem Wasser gespült, 2o Minuten in Persil gekocht, mit Wasser gespült und von jetzt ab eine Stunde in Bichromatschwefelsäure gelegt, mit Wasser gründlich gewaschen und mit Aqua dest. nachgespült.

Ansatz: Hauptgefäße:
1 ccm Lecithin 2% + 1 ccm Tween 2o 12,5% + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0,066m
+ 0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,6m.
Seitenarm: 0,3 ccm gereinigtes Bienengift 1:2oooo.
M = Kölbchen der Firma Machlett, B = Kölbchen der Firma Braun.

Ergebnis: cmm CO_2/3o Minuten.
M., 111, 116, 120, 123, 127, 120, 107, 126, 116, 113.
B., 112, 76, 84, 96, 103, 97.
Die abwegigen CO_2-Werte fallen signifikant auf die Kölbchen der Firma Braun.

Für den nächsten Versuch wurden die Kölbchen ohne Bichromatschwefelsäure gereinigt. Man verwendete außerdem bei diesem Versuch zwei Lecithinemulsionen. Die erste wurde 7 Stunden früher als die zweite hergestellt. Die zuerst bereitete Emulsion wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Ansatz: Hauptgefäße:
1 ccm Lecithin 2% + 1 ccm Tween 2o 12,5% + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0,066m + 0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,6m.
Seitenarm: 0,3 ccm gereinigtes Bienengift 1:2oooo.
a = silikonierte Gefäße, b = nicht silikonierte Gefäße.
a., 1-8, 11-12 "neue" Emulsion, 9-1o "alte" Emulsion,
b., 1-6 "alte" Emulsion.

Ergebnis: cmm CO_2/3o Minuten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o	11	12
a.,	132,	124,	115,	117,	133,	120,	9o,	127,	141,	123,	121,	140.
b.,	1	2	3	4	5	6						
	13o,	8o,	114,	149,	51,	1o2.						

Der Versuch zeigt, daß sich die CO_2-Werte der silikonierten Gefäße allmählich angleichen. Bei den nicht silikonierten Kölbchen tritt eine starke Streuung auf.
Das Alter der Lecithinemulsion ist ohne wesentlichen Einfluß.

Auch eine Erhöhung der $CaCl_2$-Konzentration kann, wie der nächste Versuch zeigt, die Streuung nicht aufheben. Vor Versuchsbeginn wurden alle Kölbchen silikoniert. Bichromatschwefelsäure wurde nicht verwendet. Um eine, durch die hohe Ca^{++}Konzentration bedingte spontane CO_2-Freisetzung zu vermeiden, erfolgte Zugabe des Giftes und erste Ablesung nach einer Stunde.

Ansatz: Hauptgefäß:
1 ccm Lecithin 2% + 1 ccm Tween 2o 12,5% + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0,26m + 0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,6m
Seitenarm: 0,3 ccm gereinigtes Bienengift 1:3oooo.

Ergebnis: ohne CO_2/H_2O Kleuten.

..., 122, 135, 90, ..., 144, 135, 145, 99.

Die Ergebnisse der einzelnen Streuungsversuche führten zu dem Ergebnis, daß die bisher übliche Reinigung der Kolonnen ohne Dinitronaturwasserstoffsäure nicht ausreicht, ja daß vielleicht erst nach der Säurebehandlung ein einwandfreier Siliziumfilm erzeugt werden kann.

Das folgende Schema soll fünf weitere Streuungsversuche veranschaulichen:

Reinigung:	I	II	III	IV	V
Ky.-Cl	+	+	+	+	+
Persil	–	+	+	+	–
Säure	+	+	–	+	+
Si-Kristall	+	+	+	–	–
ohne CO_2/H_2O Kln.	120	118	115	113	107
	118	115	111	111	107
	117	114	110	106	107
	117	114	109	102	106
	117	108	107	100	103
	115	108	104	98	95
	114	106	95	94	94
	114	105	95	60	93
	114	105	94		86
	112				80

I, II = gutes Übereinstimmen, III = mäßiges Übereinstimmen, IV, V = schlechtes Übereinstimmen.

Kolonne I wurde weiterhin beibehalten, gelegentlich wurde zusätzlich mit Persil gekocht.

2. Bestimmung des p_H-Optimums.

a., bei höherer Ca^{++}Konzentration.

Ansatz:

	+ 1 ccm		0,2 ccm + 0,1 ccm		cmm CO_2/3o Min	pH
1.	1 ccm	$NaHCO_3$ 0,15m	Pg. 1:1oooo	$NaHCO_3$ 0,15m	22o	8,02
2.		"	"	"	215	
3.	Lecithin 2%	"	NaCl 0,85%	"	37	
4.		$NaHCO_3$ 0,3m	"	$NaHCO_3$ 0,3m	2,5	
5.	+	"	Pg. 1:1oooo	"	146	8,32
6.		"	"	"	144	
7.		$NaHCO_3$ 0,6m	"	$NaHCO_3$ 0,6m	33	8,62
8.	0,5 ccm	"	"	"	35	
9.		"	NaCl 0,85%	"	-1,7	
1o.	$CaCl_2$ 0,066m	$NaHCO_3$ 0,15m	"	$NaHCO_3$ 0,15m	1,6	
11.		"	Pg. 1:1oooo	"	67	6,68
12.	+	"	"	"	67	
13.		$NaHCO_3$ 0,3m	"	$NaHCO_3$ 0,3m	119	6,98
14.	0,5 ccm	"	"	"	116	
15.		"	NaCl 0,85%	"	0,7	
16.		$NaHCO_3$ 0,6m	"	$NaHCO_3$ 0,6m	-0,8	
17.	Tween 2o 25%	"	Pg. 1:1oooo	"	134	7,28
18.		"	"	"	132	

1-9: Im Gleichgewicht mit N_2-CO_2 (95:5),
Rest: Im Gleichgewicht mit CO_2 (1oo%).

Der p_H-Wert wurde nach der Hasselbalch'schen Formel (siehe Eigelbansatz) errechnet.

Ergebnis: p_H = 8,02 = 180 cmm CO_2 = 8 Mikromol/3o Min.
p_H = 8,32 = 142 cmm CO_2 = 6,3 Mikromol/3o Min.
p_H = 8,62 = 35 cmm CO_2 = 1,5 Mikromol/3o Min.
p_H = 6,68 = 65 cmm CO_2 = 2,9 Mikromol/3o Min.
p_H = 6,98 = 116 cmm CO_2 = 5,2 Mikromol/3o Min.
p_H = 7,28 = 134 cmm CO_2 = 5,9 Mikromol/3o Min.

Das p_H-Optimum der Lecithinspaltung liegt im Gegensatz zur Eigelbemulsion etwas mehr im Sauren, bei p_H = 8 .

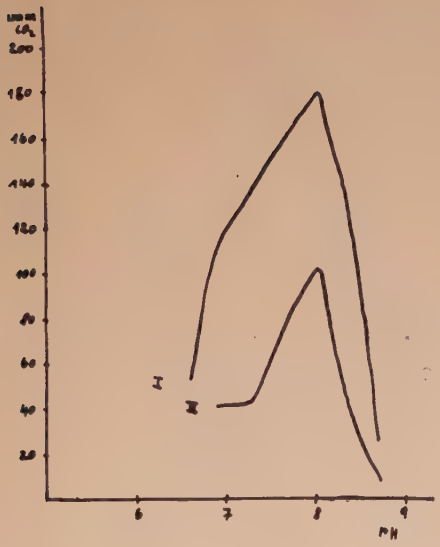


Abb. 5. p_H-Abhängigkeit der Bienengift-Phospholipase im Lecithinansatz.

Kurve I: Ca^{++}Endkonzentration 0,01m, Gift-Endkonzentration 1:165ooo.

Kurve II: Ca^{++}Endkonzentration 0,0005m, Giftendkonzentration 1:528000.

Ordinate: cmm CO_2/3o Min.;

Abszisse: p_H

Ansätze: s. Text.

b., p_H-Optimum bei niedriger Ca^{++}Konzentration.

Ansatz:

		+ 0,5 ccm	0,25 ccm + 0,05 ccm	cmm CO_2/3o Min	pH
1.	1 ccm	$NaHCO_3$ 0,3m	Pg. 1:40000 $NaHCO_3$ 0,3m	100	8,02
2.		"	" "	103	
3.	Lecithin 2%	"	NaCl 0,85% "	0	
4.		$NaHCO_3$ 0,6m	Pg. 1:40000 $NaHCO_3$ 0,6m	53	8,32
5.	+	"	" "	44	
6.		"	NaCl 0,85% "	-1,5	
7.	0,5 ccm	$NaHCO_3$ 1,2m	Pg. 1:40000 $NaHCO_3$ 1,2m	8	8,62
8.		"	" "	12	
9.	$CaCl_2$ 0,0033m	"	NaCl 0,85% "	-8,5	
10.		$NaHCO_3$ 0,6m	Pg. 1:40000 $NaHCO_3$ 0,6m	49	6,98
11.	+	"	" "	44	
12.	1 ccm	"	NaCl 0,85% "	5	
13.	Tween 2o, 12,5%	$NaHCO_3$ 1,2m	Pg. 1:40000 $NaHCO_3$ 1,2m	45	7,28
14.		"	" "	45	
15.		"	NaCl 0,85% "	4	

1-9 im Gleichgewicht mit N_2-CO_2 (95:5),
Rest: im Gleichgewicht mit CO_2 (100%).

Ergebnis: p_H = 8,02 = 102 cmm CO_2 = 4,5 Mikromol/3o Min.
p_H = 8,32 = 5o cmm CO_2 = 2,2 Mikromol/3o Min.
p_H = 8,62 = 18 cmm CO_2 = 0,8 Mikromol/3o Min.
p_H = 6,98 = 42 cmm CO_2 = 1,8 Mikromol/3o Min.
p_H = 7,28 = 41 cmm CO_2 = 1,8 Mikromol/3o Min.

Auch bei niedriger Ca^{++}Konzentration liegt das p_H-Optimum bei p_H=8. Es wird also nicht durch Änderung der Ca^{++}Molarität beeinflußt. Die niedrigeren CO_2-Werte sind durch die größere Giftverdünnung bedingt.

3. Variation des Ca^{++}Gehaltes.

Ansatz: a.,

		+ 0,5 ccm	+ 0,5 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	1 ccm	NaCl 0,85%	$NaHCO_3$ 0,3m	NaCl-$NaHCO_3$	4,23
2.		"	"	Pg. 1:15oo	375
3.	Lecithin 2%	"	"	Pg. 1:1oooo	1o3
4.		"	"	Pg. 1:4oooo	24,1
5.		$CaCl_2$ 0,264m	"	NaCl-$NaHCO_3$	12o,2
6.	+	"	"	Pg. 1:1oooo	214
7.		"	"	Pg.1: 4oooo	155
8.		"	"	Pg. 1:16oooo	1o2
9.		$CaCl_2$ 0,066m	"	NaCl-$NaHCO_3$	37
1o.	1 ccm	"	"	Pg. 1:1oooo	über 4oo
11.		"	"	Pg. 1:4oooo	143
12.		"	"	Pg. 1:16oooo	49,6
13.	Tween 2o 12,5%	$CaCl_2$ 0,0165m	"	NaCl-$NaHCO_3$	5,2
14.		"	"	Pg. 1:25oo	über 400
15.		"	"	Pg. 1:1oooo	über 400
16.		"	"	Pg. 1:4oooo	117
17.		$CaCl_2$ 0,264m	$NaHCO_3$ 0,6m	Pg. 1:4oooo	175
18.		"	"	Pg. 1:16oooo	94,5
19.		"	"	NaCl-$NaHCO_3$	75

Nr. 5,9,13,19: Kontrollen,
Nr. 5-12, 17-19 zeigen sofort nach Fermentzugabe einen starken Spontananstieg. $NaHCO_3$ 0,045m bewirkt fast keinen, $NaHCO_3$ 0,09m einen deutlichen Niederschlag

Ansatz b.,

		+ 0,5 ccm	+ 0,5 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min
1.	1 ccm	NaCl 0,85%	$NaHCO_3$ 0,3m	Pg. 1:4oooo	24,0
2.		"	"	Pg. 1:8oooo	10,4
3.	Lecithin	"	"	NaCl-$NaHCO_3$	2,42
4.		$CaCl_2$ 0,013m	"	Pg. 1:4oooo	81,5
5.	+	"	"	Pg. 1.8oooo	45,9
6.		"	"	NaCl-$NaHCO_3$	4,6
7.	1 ccm	$CaCl_2$ 0,00264m	"	Pg. 1:4oooo	83
8.		"	"	Pg. 1:8oooo	38
9.		$CaCl_2$ 0,00052m	"	Pg. 1:4oooo	57
1o.	Tween 2o 12,5%	"	"	Pg. 1:8oooo	3o
11.		$CaCl_2$ 0,013m	$NaHCO_3$ 0,15m	Pg. 1:4oooo	91,6
12.		"	"	Pg. 1:8oooo	42
13.		"	"	NaCl-$NaHCO_3$	2,4

Nr. 3,6,13 Kontrollen.

Ergebnis: $CaCl_2$ 0,04m bewirkt eine sehr starke, $CaCl_2$ 0,01m eine starke, $CaCl_2$ 0,0025m eine geringe spontane CO_2-Freisetzung. Der Spontananstieg bei hoher Ca^{++}Konzentration mag seine Ursache darin haben, daß Ca^{++} mit dem Bicarbonat in Verbindung tritt.

$$Ca^{++} + 2\ HCO_3^- = Ca(HCO_3)_2 = CaCO_3 + CO_2 + H_2O$$

$CaCl_2$ 0,04m hat keinen aktivierenden Einfluß, $CaCl_2$ 0,01m und $CaCl_2$ 0,0025m aktivieren annähernd gleich stark. Selbst bei einer Ca^{++}Molarität von nur 0,00008m macht sich dessen aktivierender Einfluß noch bemerkbar. Erhöhung der $CaCl_2$ -Konzentration führt in diesem Bereich zur Erhöhung der Fermentaktivität.

Die Aktivierung durch $CaCl_2$ durchläuft also ein Maximum, dessen Gipfel flach ist und bei 0,0025 - 0,0004 m Ca^{++} liegt.

Ein direkter, quantitativer Vergleich zwischen Ansatz a, und b, ist aus weiter unten angeführten Gründen nicht möglich. Da aber in beiden Ansätzen eine nur um 21% differierende Ca^{++} Konzentration vorkommt (0,0025 m in Ansatz a, 0,00197m in Ansatz b) und das Maximum von dieser Konzentration nach oben und unten nahezu plateauartig verläuft, erscheint dieser Schluß berechtigt.

Die verschiedenen $NaHCO_3$-Zusätze, 0,045m und 0,09m führen zu keinem eindeutigen Unterschied.

4. Einfluß des Lösungsvermittlers Tween 2o.

Da wir annahmen, daß eine Erhöhung der Löslichkeit von Lecithin auch eine bessere Angreifbarkeit durch Phospholipase mit sich bringen würde, setzten wir den Lösungsvermittler Tween 2o zu.

Ansatz:

		+ 1 ccm	+ 1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	0,5 ccm	Lecithin 2%	NaCl 0,85%	NaCl-$NaHCO_3$	0,8
2.	NaCl 0,85%	"	"	Pg. 1:5000	1,69
3.		"	"	Pg. 1:20000	-0,8
4.	+	"	Tween 2o 25%	Pg. 1:5000	136
5.		"	"	Pg. 1:20000	41
6.		"	"	NaCl-$NaHCO_3$	0
7.	0,5 ccm	"	Tween 2o 12,5%	Pg. 1:5000	166,5
8.	$NaHCO_3$ 0,3m	"	"	Pg. 1:20000	52,4
9.		"	"	NaCl-$NaHCO_3$	1,72
1o.		"	Tween 2o 6,25%	Pg. 1:5000	179
11.		"	"	Pg. 1:20000	53
12.		"	"	NaCl-$NaHCO_3$	-3,1
13.		NaCl 0,85%	Tween 2o 25%	Pg. 1:5000	0
14.		"	Tween 2o 6,25%	Pg. 1.5000	-2,5

Nr. 1,6,9,12,13,14. dienten als Kontrollen.

Ergebnis: Tween-Zusatz aktiviert. Das Optimum der Tweenkonzentration scheint noch unter 1,89% zu liegem. Der Ansatz erscheint dann aber bereits sehr trübe; deshalb blieben wir bei unseren Versuchen bei einer, die Lecithinemulsion fast völlig klärenden Tweenkonzentration von 3,79%.

5. Einfluß von $ZnSO_4$ auf die Lecithin-Spaltung.

FLECKENSTEIN und Mitarbeiter wiesen darauf hin, daß Zinkionen eine Reihe von Effekten tierischer Gifte abzuschwächen vermögen, so die Dehydrasen-inaktivierung und die Hemmung der Hitzekoagulation von Eigelb. HABERMANN hatte gefunden, daß auch der Thromboplastinabbau durch Bienengift durch Zn^{++}gehemmt wird; NEUMANN und HABERMANN (1) wiesen die Zinkhemmung der Phospholipase im Hämolyseansatz nach.

Ansatz:

		+ 0,5 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o minuten
1.	1 ccm	$ZnSO_4$ 0,1m	Pg. 1:5ooo	13,3
2.	Lecithin 2%	"	$NaCl-NaHCO_3$	5,3
3.	+	$ZnSO_4$ 0,01m	"	-0,86
4.	1 ccm	"	Pg. 1:5ooo	6,2
5.	Tween 2o 12,5%	$ZnSO_4$ 0,001m	"	62,7
6.	+	$NaCl$ 0,85%	"	166,5
7.	0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,3m	"	$NaCl-NaHCO_3$	1,72

Nr. 2,3,7 dienten als Kontrollen.

Ergebnis: $ZnSO_4$ hemmt auch im Warburg-Ansatz mit gereinigtem Lecithin stark, was noch in einer verdünnung von 0,000152m deutlich ist.

6. Abhängigkeit der Fermentaktivität von der Lecithinkonzentration.

Ansatz:

		+ 1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/ 3o Min.
1.	1 ccm Tween 2o 12,5%	Lecithin 4%	Pg. 1:4oooo	93
2.	+	Lecithin 2%	"	87,5
3.	0,5 ccm $CaCl_2$ 0,0033m	"	$NaCl-NaHCO_3$	-1,5
4.	+	Lecithin 1%	Pg. 1:4oooo	46,5
5.	0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,3m	Lecithin 0,5%	"	31

Nr. 3 = Kontrolle.

Die 1,21%ige Lecithinemulsion war stark trübe, das Reaktionsgemisch mit 0,3%igem Lecithin war fast klar, das mit 0,15% vollkommen klar.

Ergebnis: Erhöhung der Lecithin-Konzentration bewirkt eine verstärkte Spaltung. Der Steigerung der Konzentration von 0,15% auf 1,2%, also auf das Achtfache steht jedoch nur eine Intensivierung der Lecithinspaltung auf das Dreifache gegenüber.
Offenbar (s. Abb. 6) strebt die Aktivierung von Phospholipase A durch steigende Lecithinkonzentration einem Endwert zu, ähnlich wie dies ZAMECNIK, BREWSTER und LIPMANN für Phospholipase C nachgewiesen haben.

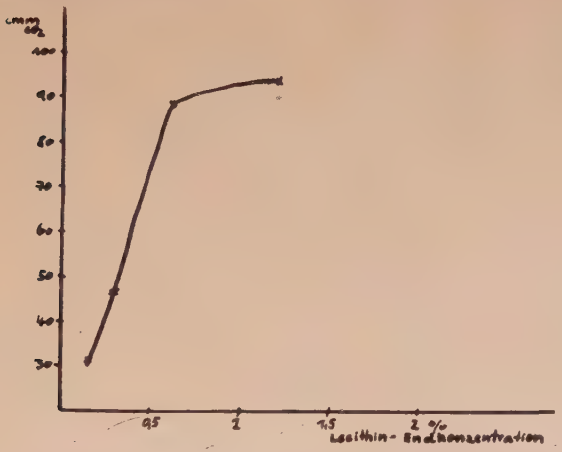


Abb. 6. Einfluß der Lecithinkonzentration auf die Fermentaktivität.
Ordinate: Cmm CO_2/3o Min.; Abszisse: Lecithin-Endkonzentration in %.
Ansätze: s. Text.

7. Zeitlicher Ablauf der Spaltung.

Als Beispiel für den zeitlichen Ablauf im Ansatz mit gereinigtem Lecithin gibt Abb. 7 a und b die Werte für die im Abschnitt 6 bzw. 8 beschriebenen Versuche wieder.
Der Kurvenverlauf war bei den anderen Ansätzen prinzipiell derselbe: Die Geschwindigkeit der Lecithinspaltung nahm im Lauf der Reaktionszeit ab.

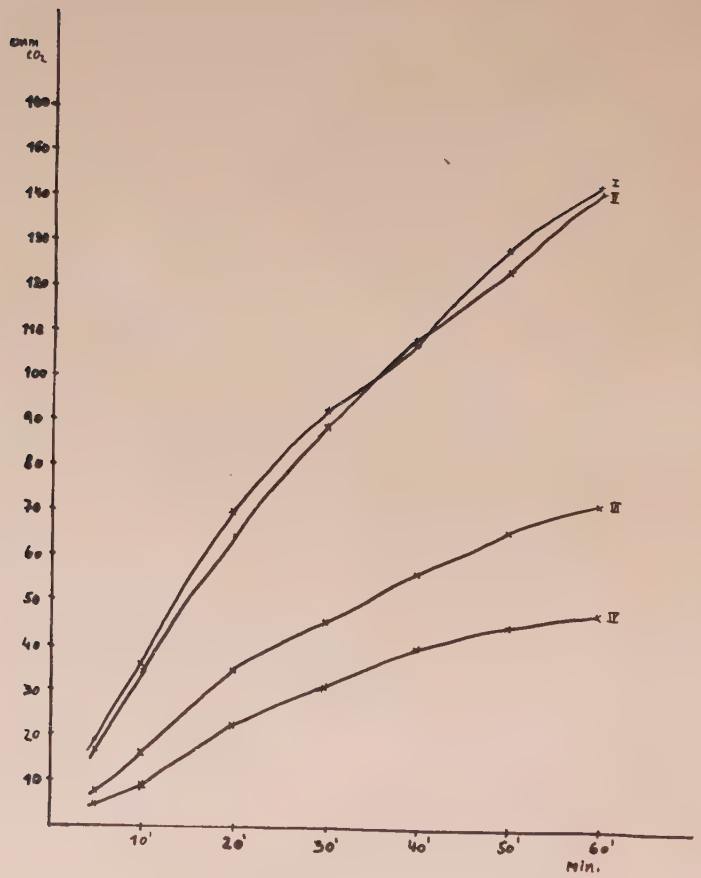
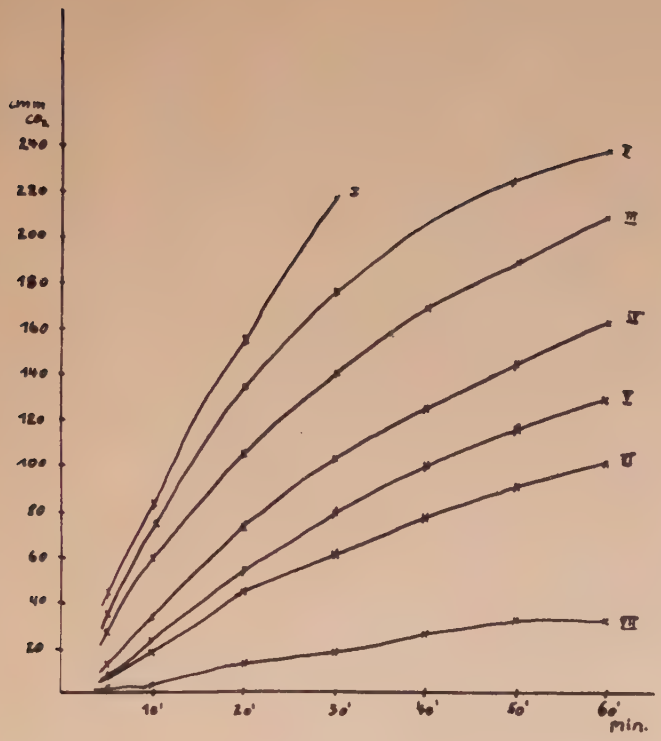


Abb. 7. Zeitlicher Ablauf des Lecithinabbaues im Lecithinansatz.
Ansätze a, 1 ccm 4% (I), bzw. 2% (II), bzw. 1% (III), bzw. 0,5% (IV) Lecithin + 1 ccm Tween 2o 12,5%+ 0,5 ccm $CaCl_2$ 0,005m + 0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,3m
Seitenarm: 0,3 ccm Pg. 1:4oooo.
Ordinate: cmm CO_2; Abszisse: Zeit in Minuten.



Ansätze b, Hauptgefäß: 1 ccm Lecithin 2% + 0,5 ccm $CaCl_2$ 0,003m + 1 ccm Tween 2o 12,5% + 0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,3m

Seitenarm: 0,3 ccm einer Bienengiftverdünnungsreihe 1:1oooo (I), 1:15ooo(II), 1:2oooo (III), 1:3oooo (IV), 1:4oooo (V), 1:6oooo (VI), 1:8oooo (VII).

Ordinate: cmm CO_2; Abszisse: Zeit in Minuten.

8. Dosis-Wirkungsbeziehung der Bienengift-Phospholipase.

Ansatz:

		0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min	Mikromol CO_2 / 3o Min nach Subtraktion des Leerwertes
1.	1 ccm	$NaCl-NaHCO_3$	- 1,69	0,00
2.	Lecithin 2%	Pg. 1:1oooo	219	9,82
3.	+	Pg. 1:15ooo	174	7,83
4.	0,5 ccm	Pg. 1:2oooo	141	6,36
5.	$CaCl_2$ 0,003m	Pg. 1:3oooo	1o3	4,66
6.	+	Pg. 1:4oooo	78	3,5
7.	1 ccm	Pg. 1:6oooo	6o	2,7
8.	Tween 2o 12,5%	Pg. 1:8oooo	17,7	0,86
9.	+	Pg. 1:12oooo	22,1	1,0
1o.	0,5 ccm	Pg. 1:16oooo	5	0,29
11.	$NaHCO_3$ 0,3m	Pg. 1:32oooo	-1,7	0,00
12.		$NaCl-NaHCO_3$	-1,5	

Ergebnis: Die Eichkurve ist leicht gekrümmt und geht nicht durch den O-Punkt des Koordinatensystems (vgl. S. 9) Kleine Giftmengen (unter ca 1 γ/ccm) ergeben demnach eine geringere Umsatzrate als zu erwarten ist. Möglicherweise tritt eine Adsorption an das Substrat oder an die Wand der Reaktionsgefäße ein.

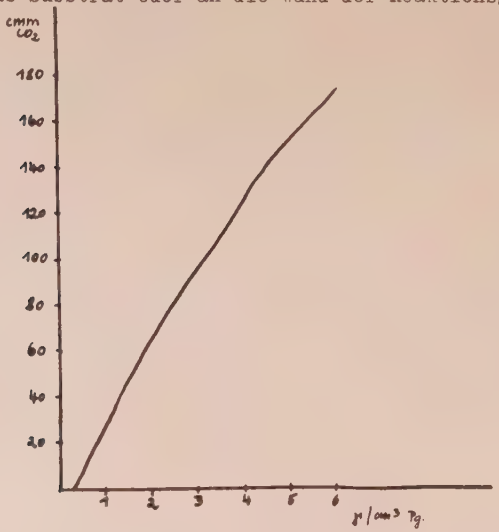


Abb. 8. Einfluß der Fermentkonzentration auf die Lecithinspaltung. Ordinate: cmm CO_2/3o Min.; Abszisse: Bienengift-Endkonzentration in γ/ccm

Bei zwei weiteren, in genau gleicher Weise angesetzten Versuchen verliefen die Eichkurven ebenfalls nicht durch den O-Punkt des Koordinatensystems; sie deckten sich aber nicht mit der in Abb. 8 wiedergegebenen, was darauf hinweist, daß eine vollkommene Standardisierung unserer Versuchbedingungen noch nicht gelungen ist. Wir möchten annehmen, daß die Art der Vorbehandlung der Kölbchen für diese Differenzen verantwortlich ist, da alle anderen Unsicherheitsfaktoren experimentell ausgeschlossen wurden.

Gegenüberstellung der Versuche zur Dosis-Wirkungsbeziehung von Bienengift Phospholipase.

	Versuch I		Versuch II		Versuch III	
Bienengift-Endkonzentration in /ccm	cmm CO_2/ 3o Min,	Mikromol CO_2/30Min.	cmm CO_2/ 3o Min.	Mikromol CO_2/30Min	cmm CO_2/ 3o Min.	Mikromol CO_2/30Min
9,1	22o	9,18				
6,o	175,6	7,83	197,5	8,7	168	7,5
4,55	142,6	6,36	152,5	6,8		
3,o	1o4,6	4,66	117,5	5,2	12o	5,3
2,28	79,6	3,5	93,5	4,17		
1,5o	61,6	2,7	48	2,1	35	1,5
1,14	19,3	0,86	27,5	1,1		
0,75	23,7	1,o	17,4	0,73	12,6	0,5
0,57	6,6	o,29				
0,37			2,7	0,12	2,5	0,1

9. Zur Frage der Stabilität von Lecithinemulsion und Giftlösung.

a., Versuche mit verschieden vorbehandeltem Lecitnin.

Ansatz:

	+ 1 ccm		0,3 ccm	cmm CO_2/ 3o Min.	Mikromol CO_2/30Min.
1.	1 ccm	Lecithin 2% I	$NaCl$-$NaHCO_3$	-1,69	
2.	Tween 2o 12,5%	"	Pg. 1:4oooo	78	3,48
3.	+	Lecithin 2% II	"	73	3,25
4.	0,5 ccm	"	"	78	3,48
5.	$CaCl_2$ 0,0033m	Lecithin 2% III	"	75,7	3,37
6.	+	"	"	87	3,87
7.	0,5 ccm	Lecithin 2% Ia	"	88	3,92
8.	$NaHCO_3$ 0,3m	"	"	84	3,7
9.		Lecithin 2% Ib	"	89	3,97

Lecithin I und II wurden gleichzeitig gelöst,
Lecithin III 3 Stunden vor Versuchsbeginn,
Lecithin Ia wurde 2 Stunden unter N_2-CO_2, Lecithin Ib 2 Stunden unter Luftatmosphäre im Warburg-Apparat geschüttelt.

Ergebnis: Zwischen den verschieden vorbehandelten und gelösten Lecithinen bestand kein grundsätzlicher Unterschied, wie dies z.T. auch schon aus den Streuungsversuchen S.16 hervorgeht.

b., Einfluß der Trocknungsart auf die Angreifbarkeit von Lecithin.

Das verwendete Lecithin wurde in der Regel in der Tiefkühltruhe unter Aceton aufbewahrt, vor Gebrauch wurde es einige Stunden im Vakuumexsiccator getrocknet. Das überschüssige, am gleichen Tage nicht mehr verwendete Lecithin wurde in der Tiefkühltruhe aufbewahrt, aber nicht mehr unter Aceton gebracht. Es wurde daher feucht und mußte vor der Wiederverwendung nochmals getrocknet werden. Da möglicherweise ein Unterschied in der Emulgierbarkeit des aus Aceton entnommenen und getrockneten Lecithins gegenüber dem feucht gewordenen und anschließend getrockneten Lecithin hätte bestehen können, mußte ein Vergleich zwischem diesen beiden Lecithinarten ("A" bzw."W") durchgeführt werden.

Ansatz:

		+ 1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.	Mikromol CO_2/3o Min.
1.	1 ccm	Lecithin 2% (A)	NaCl-$NaHCO_3$	0	
2.	Tween 2o 12,5%	"	Pg. 1:15000	168	7,5
3.	+	"	Pg. 1:30000	12o	5,3
4.	0,5 ccm	"	Pg. 1:60000	35	1,5
5.	$CaCl_2$ 0,0033m	"	Pg. 1:120000	12,6	0,5
6.	+	"	Pg. 1:240000	2,5	0,1
7.	0,5 ccm	Lecithin 2% (W)	Pg. 1:30000	135	6,02
8.	$NaHCO_3$ 0,3m	"	Pg. 1:60000	42	1,8
9.		"	Pg. 1:120000	18,7	0,8

Ergebnis: Lecithin "A" scheint etwa 15% weniger wirksam zu sein als Lecithin "B"; doch müßte die Signifikanz dieses Unterschiedes erst noch durch weitere Versuche erstärkt werden.

c., Versuche mit verschieden alten Giftlösungen.

Ansatz:

		0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min	Mikromol CO_2/3o Min.
1.	1 ccm	NaCl-$NaHCO_3$	2,5	
2.	Lecithin 2%	Pg. 1:15000	198	8,7
3.	+	Pg. 1:20000	155	6,8
4.		Pg. 1: 30000	12o	5,2
5.	1 ccm	Pg. 1:40000	96	4,17
6.	Tween 2o 12,5%	Pg. 1:60000	5o,5	2,1
7.	+	Pg. 1:80000	3o,2	1,2
8.	0,5 ccm	Pg. 1:80000	28	1,1
9.	$CaCl_2$ 0,0033m	Pg. 1:120000	19,9	0,73
1o.		Pg. 1:240000	5,2	0,12
11.	+	NaCl-$NaHCO_3$	2,3	
12.	0,5 ccm	Pg. 1:15000	2oo	8,8
13.	$NaHCO_3$ 0,3m	Pg. 1:20000	16o	7,o
14.		Pg. 1:30000	1o9	4,7
15.		Pg. 1:40000	95	4,1
16.		Pg. 1:15000	184	8,2
17.		Pg. 1:20000	164	7,2
18.		Pg. 1:30000	1o9	4,7

Nr. 2-1o Gift 5 Stunden vor Versuchsbeginn gelöst,
12-15 Gift vor Versuchsbeginn gelöst,
16-18 Gift 5 Stunden vor Versuchsbeginn gelöst; der Ansatz wurde vor Zukippen des Giftes 1 Stunde lang mit N_2-CO_2 Gas geschüttelt.

Ergebnis: Der Versuch zeigt, daß die während unserer Versuche eventuell aufgetretenen Unterschiede im Alter der Giftlösung (einige Stunden) und in der Dauer der N_2-CO_2-Durchströmung die Differenzen zwischen den Ansatzreihen verschiedener Tage nicht klären können.
Analoge Versuche im Eigelbansatz (s.S. 7) zeigten bereits, daß das Alter der Giftlösungen die Fermentwirkung nicht beeinflußt.

1o. Zur Frage der Wirkung der Lecithinspaltprodukte auf den Spaltprozeß.

Diese Frage kann bisher nur auf manometrischem Wege beantwortet werden, da im Hämolyse-oder Dotterkoagulationstest die Spaltprodukte die "Indikatorreaktion" beeinflussen.

Ansatz:

	+ 1 ccm		0,3 ccm	cmm CO_2 / 3o Min.
1.	1 ccm	Lysocithin 5%	$NaCl$-$NaHCO_3$	1,69
2.	Lecithin 2%	Lysocithin 0,5%	"	-4,8
3.		NaCl 0,85%	"	0
4.		Lysocithin 5%	Pg. 1:1ooo	71,4
5.	+	"	Pg. 1:5ooo	18,6
6.		"	Pg. 1:25ooo	-
7.	0,5 ccm	Lysocithin 0,5%	Pg. 1:1ooo	71,5
8.	$CaCl_2$ 0,0033m	"	Pg. 1:5ooo	28,5
9.		"	Pg. 1:25ooo	3,4
1o.		NaCl 0,85%	Pg. 1:1ooo	5o,5
11.	+	"	Pg. 1:5ooo	9,15
12.		"	Pg. 1:25ooo	3,5
13.	0,5 ccm	Ölsäure 5% (als Na-Salz)	Pg. 1:1ooo	0
14.	$NaHCO_3$ 0,3m	"	Pg. 1:5ooo	0,85
15.		"	Pg. 1:25ooo	0
16.		"	$NaCl$-$NaHCO_3$	1,77
17.		Ölsäure 0,5%	Pg. 1:1ooo	1o,4
18.		"	Pg. 1:5ooo	6,2
19.		"	$NaCl$-$NaHCO_3$	1,63

Ergebnis: Lysocithin 1,51% und 0,151% aktivieren annähernd gleich stark. Ölsäure 0,151% blockiert die Lecithinspaltung fast total.

Der nächste Versuch soll noch einmal die Wirkung der Spaltprodukte veranschaulichen:

Ansatz:

		+ 1 ccm	+ 1 ccm	0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	0,5 ccm	NaCl 0,85%	Lysocithin 1%	NaCl-$NaHCO_3$	-3,4
2.	$CaCl_2$ 0,0033m	"	"	Pg. 1:1ooo	3,2
3.		"	"	Pg. 1:5ooo	1,69
4.		Lecithin 2%	"	Pg. 1:1ooo	64,5
5.		"	"	Pg. 1:5ooo	-5,95
6.		"	"		
7.	+	"	Ölsäure 0,5% (als	Pg. 1:1ooo	16,3
8.		"	" Na-Salz)	Pg. 1:5ooo	5,15
9.		Lysocithin 1%	"	NaCl-$NaHCO_3$	2,54
10.	0,5 ccm	"	"	Pg. 1:1ooo	-12,4
11.	$NaHCO_3$ 0,3m	"	"	Pg. 1:5ooo	-13,8
12.		Lecithin 2%	NaCl 0,85%	Pg. 1:1ooo	52
13.		"	"	Pg. 1:5ooo	5,2
14.		"	"	NaCl-$NaHCO_3$	0,8

Ergebnis: Auch dieser Versuch zeigt Lysocithin als Aktivator, Ölsäure als Inhibitor. Lysocithin selbst wird nicht gespalten. Fermenteinwirkung auf ein Lysocithin-Ölsäure-Gemisch ergibt eine relativ starke CO_2-Adsorption, was auf ein Verschwinden saurer Gruppen und damit auf eine mögliche Resynthese des Lecithins hindeutet.

Der nächste Versuch soll noch einmal den CO_2-Schwund bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lysocithin, Ölsäure und Bienengift zeigen:

Ansatz:

		0,3 ccm	cmm CO_2/3o Min.
1.	1 ccm Lysocithin 1% +	Pg. 1:1ooo	-7,6
2.	1 ccm Ölsäure 0,5% (als Na-Salz)+	Pg. 1:5ooo	-1o,4
3.	0,5 ccm $CaCl_2$ 0,0033m +	Pg. 1:25ooo	-3,4
4.	0,5 ccm $NaHCO_3$ 0,3m	Pg. 1:125ooo	-2,5
5.		NaCl-$NaHCO_3$	-2,2

B e s p r e c h u n g .

Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war es, ein manometrisches Verfahren zur Bestimmung von Phospholipase A auszuarbeiten. Ein solches Verfahren war deshalb notwendig geworden, weil die bisher üblichen Methoden für bestimmte Zwecke entweder zu ungenau oder zu unempfindlich waren. Zudem

erlauben sie größtenteils nicht ohne weiteres die Verfolgung des zeitlichen Ablaufs der Lecithinspaltung. Außerdem ist mittels der Testung eines Lecithase-Ansatzes an einer Erythrozytensuspension keine quantitative Aussage über die Menge des tatsächlich gebildeten Lysocithins möglich, weil nach unveröffentlichten Versuchen von HABERMANN Lecithin die Lysocithinwirkung schwächt. Auch die übrigen biologischen Verfahren wie Dotterkoagulations,-Dehydrasen-und Thrombokinasetest führen in dieser Hinsicht zu keinen quantitativen Angaben. Andererseits sind die Titrationsmethoden, welche die freigesetzte Säure quantitativ erfassen, nur schwer bei kleinen Substrat-bzw. Enzymmengen anwendbar.
Die manometrische Methode vereinigt also drei wichtige Vorteile:
a, sie gibt quantitativ die Menge des gespaltenen Lecithins wieder,
b, sie ist sehr empfindlich,
c, sie erlaubt eine zeitliche Verfolgung des Ablaufes der Reaktion.

Dem gegenüber ist allerdings die Reproduzierbarkeit bei unserem Verfahren beschränkt. Wie zahlreiche Streuungsversuche bewiesen, hängt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse außerordentlich stark von der Art der Reinigung der Kölbchen ab, aber selbst bei sorgfältigster Säuberung und Silikonierung sind verläufig nur die Ergebnisse einer einzigen, in gleicher Weise angesetzten Versuchsreihe unter sich vergleichbar; Versuche, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, zeigen starke Abweichungen, sodaß eine absolute, d.h. von einem Vergleichsprinzip unabhängige, Standardisierung von Phospholipase A anhand der CO_2-Freisetzung noch nicht möglich war. Aus diesem Grunde liefen bei unseren Versuchen stets eine Reihe von Kontrollen mit, zu denen die übrigen Ansätze jeweils in Relation gesetzt werden konnten.

Die Wirksamkeit des Fermentes wurde gegenüber verdünntem Eigelb und gegenüber Emulsionen von gereinigtem Lecithin geprüft. Zwischen den Ansätzen mit diesen beiden Substraten bestehen deutliche Unterschiede. Die Aktivität des Fermentes ist im Eigelbansatz höher als in dem mit gereinigtem Lecithin. Das p_H-Optimum liegt im Eigelbansatz bei 8,3, während es im Lecithinansatz bei 8,0 liegt. Ca^{++} aktiviert im Lecithinansatz sehr stark, während es dies im Eigelbansatz höchstens angedeutet tut. Die Beziehung zwischen Lecithasekonzentration und Menge des gespaltenen Substrates ergibt im Eigelbansatz eine etwas stärker gekrümmte Kurve als im Lecithinansatz. Interessant erscheint dabei der Kurvenverlauf bei sehr niedrigen Fermentkonzentrationen: Die Kurve verläuft bei dem Lecithinansatz nicht durch den O-Punkt des Koordinaten - systems, sondern trifft die Abszisse, auf der die Giftkonzentrationen

aufgetragen sind, schon vorher. Dies spricht dafür, daß entweder das Ferment selbst oder das freigesetzte Kohlendioxyd in von ihrer Konzentration unabhängiger Weise adsorbiert oder sonst wie inaktiviert werden. Einen prinzipiell ähnlichen, wenn auch nicht so ausgeprägten Verlauf der Konzentrationsabhängigkeits-Kurve in niedrigen Bereich zeigt auch der Eigelbansatz.

Der zeitliche Ablauf der Spaltung ist in den Ansätzen mit Eigelb und gereinigtem Lecithin unter den verschiedensten Bedingungen prinzipiell derselbe: Stets nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit mit der Zeit ab. Ob dies auf eine zunehmende Adsorption des Fermentes an das Substrat oder auf die während der Reaktion erfolgende Abnahme des Substrates zu beziehen ist, läßt sich aufgrund unserer Versuche nicht beurteilen.

Das Verhalten gegenüber Aktivatoren und Inhibitoren weist darauf hin, daß einerseits Emulsionsgrad, andererseits Metallionen eine erhebliche Rolle spielen. So kann im Lecithinansatz eine außerordentlich starke Aktivierung durch Zusatz eines Lösungsvermittlers-Tween 2o - erzielt werden. Ca^{++} aktiviert, wie bereits erwähnt, in diesem Ansatz sehr stark. Dem entspricht, daß im Eigelbansatz, der ja von vornherein bereits erhebliche Mengen von Ca^{++} enthält, Fluorid und Zitrat deutlich hemmen. Schwermetallionen, Zn^{++} und Hg^{++}, inhibieren gleichfalls sehr stark. Möglicherweise bilden sie Komplexe mit dem Substrat, dessen isoelektrischer Punkt im Sauren liegt. Schwer zu deuten ist die Wirkung des Phosphat-Ions. Es besitzt gegenüber der Bienengift-Phospholipase eine nur sehr schwache Hemmwirkung. Dagegen wird die des Crotalus-terrificus-Giftes außerordentlich stark inhibiert. Möglicherweise beruhen Unterschiede, welche zwischen der Dehydrasenhemmwirkung des Crotalus-terrificus-Giftes und seiner Aktivität im Phospholipaseansatz gefunden wurden (Übers. bei NEUMANN), auf einem verschiedenen Phosphatgehalt der Ansätze.

Besonders interessant erscheint der Einfluß der bei der Lecithin-Spaltung auftretenden Reaktionsprodukte Lysocithin und Ölsäure. Während Lysocithin, wohl infolge seiner Eigenschaft als Lösungsvermittler, im Lecithinansatz aktiviert, hemmt Ölsäure sehr stark. Diese beiden Substanzen entstehen in wirksamen Konzentrationen auch in unserem Ansatz. Es tritt damit während der Spaltungsreaktion ein Aktivator und ein Inhibitor auf, also gleichzeitig eine Selbstbeschleunigung und eine Selbsthemmung der Reaktion, wodurch sie schwer überschaubar wird

und nicht in ein einfaches Schema zu bringen ist. Möglicherweise wirken verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren nicht auf die eigentliche, primäre Fermentreaktion, sondern nur indirekt durch Beeinflussung der während der Reaktion auftretenden Aktivatoren und Inhibitoren. Es ist z.B. vorstellbar, daß Ca^{++} die entstehende Ölsäure als Ca-Salz fällt und so diesen Inhibitor aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

Zusammenfassung.

Eine manometrische Methode zur Verfolgung der Aktivität von Phospholipase A bei der Spaltung von Eigelb-oder Reinlecithin wird angegeben.

Die Streuungsbreite beträgt innerhalb einer Ansatzreihe sowohl im Lecithin- als auch im Eigelbansatz maximal $\pm$ 5%, ist aber zwischen Versuchsreihen verschiedener Tage wesentlich höher. Die zu Beginn der Untersuchungen aufgetretenen sehr starken Streuungen waren nicht durch Ca^{++}-Niederschläge oder durch Schwankungen im Verteilungsgrad unterschiedlich vorbehandelter Lecithinemulsionen oder durch Aktivitätsänderung des Giftes, sondern durch Unterschiede in der Beschaffenheit und im Reinigungsgrad des Glases der Manometerkölbchen bedingt.

Im Eigelbansatz liegt das p_H-Optimum bei p_H = 8,3, im Lecithinansatz bei p_H = 8,0. Änderung der Ca^{++}-Konzentration im Lecithinansatz hat keinen Einfluß auf das p_H-Optimum.

Die Geschwindigkeit der Lecithinspaltung sinkt im Eigelb-und im Lecithinansatz mit steigender Bebrütungszeit.

Mit steigender Lecithin- bzw. Eigelbkonzentration nimmt die Umsatzrate zu, jedoch in keinem Falle direkt proportional der Erhöhung der Substratkonzentration.

Die Lecithinspaltung ist in einem bestimmten Bereich annähernd proportional der Fermentkonzentration, jedoch verläuft die Eichkurve im Lecithinansatz nicht durch den O-Punkt des Koordinatensystems.

Phospholipase A des Crotalus-terrificus-Giftes ist im Eigelbansatz ungefähr 8 x schwächer als die des Bienengiftes und wird durch Phosphationen stark gehemmt.

Die Bienengift-Lecithase A wird im Eigelbansatz durch Zusatz von NaF, Na_2HPO_4, Na-Zitrat, $ZnSO_4$ und $HgCl_2$ weitgehend geschwächt.

Im Eigelbansatz hat Ca^{++} in den untersuchten Konzentrationen verständlicherweise keinen erheblichen Einfluß auf die Lecithinspaltung. Im Lecithinansatz dagegen aktiviert Ca^{++} in einem breiten Konzentrationsbereich die Fermentwirkung. Größere (z.B. 0,04m) und kleinere

(z.B. 0,00008m) Ca^{++}-Konzentrationen aktivieren weniger stark.

Der Lösungsvermittler Tween 2o aktiviert die Bienengift-phospholipase im Lecithinansatz in niedrigen Konzentrationen, in höheren hemmt er sie.

Der Einfluß der Lecithin-Spaltprodukte, Lysocithin und Ölsäure, ist gegensinnig. Lysocithin fördert die Lecithin-Spaltung, Ölsäure hemmt sie. Bebrütet man ein Gemisch von Lysocithin und Ölsäure mit Bienengift, so tritt ein geringer CO_2-Schwund ein. Dies könnte darauf hindeuten, daß zwischen Lecithin und seinen Spaltprodukten ein gewisses Gleichgewicht möglich ist.

Herrn Professor Dr.Dr. N e u m a n n möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit im Pharmakologischen Institut meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Herrn Privatdozenten Dr. H a b e r m a n n möchte ich für seine persönliche Hilfsbereitschaft und liebenswürdige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit aufrichtig danken.

Literaturverzeichnis.

Boquet, P., Dworetzky, M. u. Essex, H.E., Amer.J. Physiol. 161, 561, (1950).

De, S.S., Indian J.Med.Res. 27, 793 (1940).

Delezenne, C.u.Ledebt, S., C.R.hebd. Seances Acad, Sci. 153, 81 (1911);zit.n.Chem.Zbl. 82, II, 624 (1911).

Delezenne, C.u. Fourneau, E., Bull. Soc.chim.France, 15, 421 (1914);zit.n.Chem.Zbl. 85, II, 52 (1914).

Ercoli, A., in Nord-Weidenhagen, Hdb.d.Enzymologie, 480, I (1940).

Fairbairn, D., J.biol.Chem. 157, 633 (1945).

Fleckenstein, A.u.Fettig, B.,Z.Naturforsch. 6b, 213 (1951).

Fleckenstein, A.u. Gerkhardt, H.,Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmakol. 214, 135 (1951).

Fleckenstein, A.u. Jaeger, W., Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmakol. 215, 163 (1952).

Flexner, S.u. Noguchi, H., J.exp.Med. 6, 277 (1902); zit. n. Ercoli.

Franzl, R.E.u.Rapport, M.M., Fed.Proc. 14, 213 (1955).

Gronchi, V., Sperimentale, 90, 223 (1936).

Habermann, E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. Pharmakol. 218, 108 (1953); 222, 173 (1954)

Habermann, E.u.Neumann, W., Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chemie 297, 179 (1954).

Hanahan, D.J., J.biol.Chem. 195, 199 (1952).

Hughes, A., Biochem.J. 29, 437 (1935).

Jaeger, W., v.Graefe's Arch.Ophthalmol. 154, 401, 431 (1953).

Kudicke, R.u.Sachs, H., Biochem.Z. 76, 359 (1916).

Lotter, R., Diss. Wzbg.(1953).

Magistris, H., Biochem.Z. 210, 85 (1929).

Neumann, W., Naturwissensch. 41, 322 (1954).

Neumann, W., Habermann, E.u. Amend, G., Naturwissenschaft. 39, 286 (1952).

Neumann, W.u. Habermann, E. (I), Hoppe-Seyler's Z.f. physiol. Chem. 296, 166 (1954).

Neumann, W.u. Habermann, E.,Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmakol. 222, 367 (1954).

Neumann, W., Habermann, E.u. Hansen, H., Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmakol. 217, 130 (1953).

Ogawa. K., J.Biochemistry (Tokyo), 24, 389 (1936).

Rapport, M.M.u. Alonzo, N., J.biol.Chem. 217, 193 (1955).
Rousseau, E., C.R. Seances Soc.Biol. 117, 565 (1934); zit.n. DE, Indian J.Med. Res. 27, 793 (1940).

Zeller, E.A., in Sumner-Myrbäck, The Enzymes, New-York, 1,2 S. 986 (1951).
Zamecnik, P.C., Brewster, L.E.u. Lipmann, F., J.exp. Med. 85, 381 (1947).
Zamecnik, P.C.u. Lipmann, F., J.exp.Med. 85, 395 (1947).

LEBENSLAUF

Am 14. September 1929 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Andreas Wagner und seiner Ehefrau Hilde, geb. Planansky, in Schönlinde/ Č.S.R. geboren. 1936 wurde ich in Deutsch-Liebau/Mähren eingeschult. Im Mähr.-Schönberg besuchte ich bis April 1944 die Oberschule für Mädchen, nach der Ausweisung aus dem Sudetenland von 1946-1947 die Oberschule in Wittenberg. Das Abitur legte ich 1949 an der Oberrealschule in Würzburg ab. Mein zahnmedizinisches Studium begann ich im Wintersemester 1949 in Würzburg. Im April 1952 erfolgte die zahnärztliche Vorprüfung, im Oktober 1954 das Staatsexamen.
Vom November 1954 bis Februar 1955 war ich als Volontärassistentin an der Universitätsklinik für Zahn,-Mund-und Kieferkrankheiten, Würzburg, anschließend ein Jahr als Assistentin bei Dr. Rudolf Lutz, Würzburg, tätig. Im April 1956 nahm ich eine Assistentenstelle in Marktbreit an.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Christa Wagner

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG EGLOFFSTEINSTR. 5